

DISPOSITIF DE TRAVAIL COMPORTANT DES ZONES DE
TRAVAIL BORDEES, LABORATOIRE SUR PUCE ET
MICROSYSTEME

5 **Domaine technique de l'invention**

La présente invention se rapporte à un dispositif de travail comportant des zones de travail bordées, à un laboratoire sur puce et à un microsystème comprenant ce dispositif, notamment à une puce
10 biologique. La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication d'un dispositif de l'invention.

La présente invention permet d'obtenir une matrice de gouttes localisées, à haute densité, sur une
15 surface, à partir d'un liquide d'intérêt. Elle permet d'assurer facilement la transition d'une chambre fluïdique fermée, appelée boîte de travail, et remplie par un liquide d'intérêt à une matrice de gouttes, ou micro-volumes, parfaitement localisées sur une surface
20 placée dans ladite chambre, lorsque le liquide d'intérêt est évacué de ladite chambre fluïdique.

Par matrice de gouttes, on entend un arrangement déterminé desdites gouttes, sans qu'une forme géométrique particulière dudit arrangement soit
25 exigée. La matrice de gouttes peut être ronde, carrée, polygonale et même aléatoire, l'essentiel étant que les gouttes formées soient disposées de manière localisée et déterminée sur la surface conformément à l'objectif atteint par la présente invention. Dans le contexte de
30 la présente invention, par « localisée », on entend circonscrite, individualisée et distincte des autres

gouttes capturées volontairement sur ladite surface grâce au dispositif de l'invention.

Chacune des gouttes peut être soumise à une ou plusieurs opérations destinées à analyser qualitativement et/ou quantitativement un ou plusieurs analyte(s) présent(s) ou susceptible(s) d'être présent(s) dans le liquide d'intérêt, par exemple une molécule, un oligonucléotide, une protéine, etc. L'analyse des analytes dans la goutte peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier pour effectuer des analyses, en particulier dans un volume de liquide aussi réduit qu'une goutte. Il peut s'agir des techniques d'analyse utilisées sur les puces biologiques. L'analyse peut ou non faire intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente invention.

Chacune des gouttes forme un volume dans lequel des réactions chimiques ou biochimiques peuvent être réalisées. Toute réaction chimique ou biochimique connue de l'homme du métier peut être réalisée dans ce volume. Ces réactions peuvent ou non faire intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente invention. Lorsque ces réactions font intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, elles peuvent le faire avec une seule goutte ou plusieurs gouttes déposées successivement sur cette surface, ces gouttes successives étant constituées d'un seul ou de plusieurs liquides d'intérêt différents suivant la mise en œuvre de la présente invention. Un

exemple de réactions chimiques faisant intervenir deux liquides d'intérêt différents sur un dispositif de l'invention est le suivant : au moyen d'une goutte d'un premier liquide d'intérêt, dépôt localisé d'un film
5 d'un polymère organique sur la surface couverte par cette goutte, puis, au moyen d'une goutte d'un deuxième liquide d'intérêt, fonctionnalisation du film polymère organique déposé sur cette surface.

Selon la présente invention, analyse(s) et
10 réaction(s) chimique(s)/biochimique(s) peuvent être mises en œuvre de manière exclusive sur un dispositif conforme à la présente invention (analyse ou réaction), ou de manière complémentaire. Dans ce dernier cas, cela peut être simultanément (réaction et analyse) ou
15 successivement (réaction puis analyse ou analyse puis réaction). En outre, plusieurs analyses et/ou plusieurs réactions peuvent se succéder. Par exemple, le dispositif de la présente invention peut
20 avantageusement intervenir, d'une part dans la fabrication d'une carte, ou laboratoire sur puce (par exemple par des réactions chimiques permettant de déposer un polymère, puis de le fonctionnaliser) (« lab-on-chip »), dans laquelle toutes les étapes nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives
25 d'un liquide d'intérêt sont intégrées : manipulation de fluide, réactions chimiques et/ou biochimiques, puce de détection optique, électrique et/ou chimique, etc. ; et d'autre part dans l'utilisation de cette carte, ou laboratoire sur puce, pour effectuer des analyses
30 qualitatives et/ou quantitatives dans des gouttes d'un

liquide d'intérêt à analyser (réaction(s) chimique(s)/biochimique(s) et analyse).

Dans la présente description, les références entre crochets [] renvoient à la liste de références annexée.

Etat de la technique

Selon les applications envisagées, cette invention se rapproche du domaine général de la formation de gouttes, du travail en micro-volume(s), des matrices à haute densité de gouttes.

La formation de zones localisées pour isoler une phase liquide est répandue dans le domaine des puces biologiques, et notamment des puces à ADN. Pour ces applications, le volume réactionnel est souvent très réduit pour économiser les produits biologiques et les réactifs.

Pour la formation de gouttes localisées et de matrices à haute densité de gouttes, les sociétés Protogene Laboratories Inc. [1] et Affymetrix Inc. [2] utilisent une technique utilisant un système de dispense automatisé. Ces systèmes conduisent à la formation de gouttes et de matrices à haute densité de plots ou de gouttes sur une surface.

Cependant, outre le système de dispense de gouttes, ces techniques nécessitent toutes l'utilisation d'un dispositif de déplacement et d'alignement précis de ce système, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en liquide. Le coût de cet appareillage est élevé. En outre, la densité maximale des matrices de gouttes qui peuvent être

formées est limitée par une combinaison entre la taille des gouttes dispensées et le pas minimal inter-plots du système de dispense.

5 Pour la formation de matrices à haute densité de micro-cuvettes, deux exemples significatifs peuvent être cités : la formation d'un réseau de cuvettes micro-fabriquées par gravure dans une plaque de silicium pour réaliser des amplifications d'ADN par PCR en micro-volumes de quelques picolitres, et la
10 formation de puits ou de canaux par photolithographie sur des résines photosensibles déposées sur un substrat en plastique [3]. Avec ces techniques, le nombre de puits varie de 100 à 9600 puits, avec des diamètres de 60 à 500 μm et des profondeurs de 5 à 300 μm .

15 Cependant, les bords de ces cuvettes ne laissent pas de séparation physique entre la phase liquide au sein de la cuvette et celle à l'extérieur de celle-ci, autorisant donc des connexions entre les cuvettes, et donc des contaminations entre elles. En
20 outre, ces dispositifs nécessitent pour leur utilisation des systèmes de dispense de gouttes, un dispositif de déplacement et d'alignement précis de ce système, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en liquide. On retrouve donc les mêmes inconvénients et
25 problèmes que ceux précités.

Pour la détection électrique ou électrochimique dans les tests biologiques, un grand nombre de systèmes de détection électrique ou électrochimique décrits dans la littérature ne permet pas de descendre sous le
30 nanomolaire en termes de limite de détection,

limitation souvent due au faible nombre d'électrons générés par chaque hybride.

Les techniques faisant intervenir une accumulation enzymatique permettent d'abaisser cette
5 limite de détection aux environs du picomolaire du fait de l'amplification élevée du nombre d'espèces rédox à détecter présentes dans le milieu réactionnel [4]. Cependant, cette méthode d'amplification engendre un problème pour les systèmes multiplots connus
10 actuellement car le composé rédox diffuse et peut ainsi contaminer les plots voisins.

Dans ce but, la plupart du temps, l'utilisation de structures tridimensionnelles (utilisation de compartiments) est recommandée dans la littérature. Par
15 exemple, Infineon [6] propose des murs en polymères et un système de migration des molécules par des forces électriques, de manière à les confiner dans un volume défini et à éviter ainsi la contamination inter-plots. Malheureusement, des problèmes de remplissage fluide
20 peuvent être rencontrés avec ce genre d'approche lorsqu'on souhaite par exemple travailler en veine liquide très fine. Là aussi, un distributeur de gouttes devient indispensable.

Il existe donc un réel besoin d'un dispositif
25 permettant d'obtenir aisément une matrice de gouttes à haute densité à partir d'un liquide d'intérêt, utilisable sans aucun appareillage de dispense de gouttes, facile à fabriquer, permettant d'éviter efficacement des contaminations entre les gouttes, et
30 qui peut être utilisé de manière très souple avec tous les procédés actuellement connus de l'homme du métier

pour analyser collectivement ou individuellement des micro-volumes, par exemple sur un laboratoire sur puce, qu'il s'agisse d'un procédé chimique, électrique ou optique ou d'une combinaison de ces procédés.

5

Exposé de l'invention

La présente invention répond précisément à ce besoin, et à d'autres encore, expliqués ci-dessous, en fournissant un dispositif de travail comprenant :

10 - une boîte de travail munie de moyens d'introduction d'un liquide d'intérêt dans la boîte et de moyens d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte,

 - un substrat comportant une surface active
15 sensiblement non mouillante vis-à-vis dudit liquide d'intérêt et enfermée dans ladite boîte,

 - plusieurs zones de travail formées sur
 ladite surface active de manière distincte et entourées
 chacune par une bordure formée sur ladite surface
20 active sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, les bordures ne se touchant pas entre elles et n'ayant pas de bord commun,

 dans lequel les moyens d'introduction et
 d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte sont
25 disposés sur ladite boîte de travail de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans la boîte, il couvre les zones de travail et leur bordure respective, et

 dans lequel les bordures ont une géométrie
30 telle que lorsque le liquide d'intérêt est extrait de la boîte, après y avoir été introduit, une goutte de

liquide d'intérêt reste prisonnière par chaque bordure et en contact de la zone de travail qu'elle entoure.

La présente invention répond également à ce besoin en fournissant un laboratoire sur puce
5 comprenant un dispositif selon l'invention.

La présente invention répond également à ce besoin en fournissant un système comprenant un dispositif selon l'invention.

10 Le dispositif de la présente invention permet d'effectuer sans appareillage de dispense de gouttes, une transition d'un volume de liquide d'intérêt présent dans une chambre fluïdique, constituée par la boîte de travail, vers une multitude de gouttes dudit liquide
15 retenues par les micro-cuvettes indépendantes constituées par les bordures entourant les zones de travail, au sein desquelles peuvent se trouver par exemple un capteur ou un actionneur, optique, électrique, magnétique, mécanique, électrostatique,
20 etc.

Dans le contexte de la présente invention, un liquide est dit « d'intérêt » dès lors que ce liquide est destiné à être capturé par des bordures d'un dispositif selon l'invention, pour former une matrice
25 de gouttes de ce liquide.

Par « liquide d'intérêt », on entend tout liquide susceptible de nécessiter une disposition en matrice de gouttes sur un support, par exemple dans un but analytique et/ou chimique et/ou biochimique. Par
30 « but chimique et/ou biochimique », on entend toute réaction chimique et/ou biochimique qui peut être

réalisée dans un liquide. Par « but analytique », on entend toute analyse qualitative et/ou quantitative qui peut être réalisée dans un liquide.

Le liquide d'intérêt peut être organique ou aqueux. Il peut s'agir d'un quelconque des liquides
5 actuellement manipulés en laboratoire ou dans l'industrie, par exemple sur des laboratoires sur puce. Il peut s'agir par exemple d'un liquide choisi parmi une solution, un solvant, un réactif, un échantillon,
10 un extrait cellulaire, un prélèvement provenant d'un organisme animal ou végétal, un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. Il peut s'agir d'un liquide biologique ou chimique. Ce liquide d'intérêt peut être un liquide dilué, si nécessaire,
15 pour son utilisation avec le dispositif de la présente invention, comme cela peut se faire sur les laboratoires sur puce. Un produit solide peut être mis en solution pour constituer un liquide d'intérêt au sens de la présente invention. Ce produit solide peut
20 être choisi par exemple parmi un produit chimique ou biochimique, un réactif, un matériau à analyser, un prélèvement provenant d'un organisme animal ou végétal, un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. L'homme du métier connaît la
25 manipulation de tels produits et liquides d'intérêt.

Le substrat du dispositif de l'invention constitue en fait le support sur lequel est formée la surface active avec ses zones de travail et leur
bordure respective. Le substrat peut être constitué de
30 tout matériau approprié pour la mise en œuvre de la présente invention. Il peut s'agir par exemple d'un des

matériaux de base utilisés pour fabriquer les laboratoires sur puce, puces biologiques, microsystemes, etc. Il peut s'agir par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué de silicium, d'oxyde de silicium, de nitrure de silicium, de verre, de plastique, d'un polymère organique, et d'un métal ou d'un alliage de métal. Les polymères organiques peuvent être par exemple choisis dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cycloooléfines. Le métal peut être choisi par exemple dans le groupe constitué par Au, Ti, Pt, Al, Ni, Sn et l'alliage de métal peut être de l'acier inox.

Par surface active, on entend surface du substrat sur laquelle sont formées les zones de travail entourées par leur bordure. Selon l'invention, le substrat peut comporter une ou plusieurs surfaces actives. La surface active peut être constituée de tout matériau sensiblement non mouillant vis-à-vis de liquide d'intérêt et approprié pour mettre en œuvre la présente invention. En effet, le fonctionnement du dispositif de la présente invention repose en partie sur le fait que la surface active ne retient pas ou très peu le liquide d'intérêt, ce qui permet un dé-mouillage total, facile, sans rétention du liquide d'intérêt sur la surface entre les bordures, et ceci sans séchage. Ainsi, les gouttes de liquide d'intérêt sont capturées sélectivement et exclusivement par les bordures et sont circonscrites aux zones de travail qu'elles entourent, ce qui évite tout problème de

contamination entre les gouttes, et donc entre les zones de travail.

Par surface sensiblement non mouillante vis-à-vis de liquide d'intérêt, on entend surface sur laquelle le liquide d'intérêt possède une faible adhérence, c'est à dire que si on fait couler le liquide d'intérêt sur une telle surface, il ne laisse pas de traces, ni de gouttes. Toutefois, la capture devient difficile, voire impossible, dans le cas où le liquide d'intérêt ne mouille absolument pas la surface. De la même façon, si la surface est totalement mouillante, il deviendra impossible d'aspirer le liquide d'intérêt. Ainsi, de préférence, la surface sensiblement non mouillante forme un angle de contact avec le liquide d'intérêt auquel le dispositif de l'invention est destiné de au moins 60° , de préférence de 60 à 90° . Par exemple, lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, le matériau formant la surface active est avantageusement hydrophobe, avec de préférence un angle de contact de 60 à 110° .

Aucune modification chimique de la surface du substrat n'est requise si le substrat est constitué d'un matériau déjà sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt.

En revanche, si la surface du substrat n'est pas déjà sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, un traitement de surface peut être nécessaire pour la rendre sensiblement non mouillante. Dans ce cas, le matériau de la surface active est notamment choisi en fonction du liquide d'intérêt à partir duquel une matrice de gouttes doit être formée,

en fonction du substrat, et aussi en fonction des zones de travail. Il peut être formé sur le substrat par modification chimique de la surface du substrat ou par dépôt sur cette surface d'un matériau sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt.

Par exemple, lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, le matériau formant la surface active est avantageusement hydrophobe. Par exemple, dans les exemples de matériaux précités constituant le substrat, la surface du substrat peut être rendue non mouillante, ici hydrophobe, par modification chimique, par exemple par silanisation avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyltrichlorosilane. Il peut s'agir par exemple aussi d'un dépôt de téflon liquide sur plateau tournant ; d'une silanisation en phase gazeuse de silane hydrophobe ; de l'utilisation de silane hydrocarboné, par exemple du type octadécyltrichlorosilane. Les matériaux et procédés utilisables pour la mise en œuvre de telles modifications chimiques sont connus de l'homme du métier. Un exemple de réalisation est donné ci-dessous.

La forme et la taille de cette surface active, et donc aussi du substrat sur lequel elle est formée, n'ont pas d'importance pour le fonctionnement du dispositif de l'invention. Elles peuvent être déterminées par exemple en fonction du nombre de bordures couplées à des zones de travail formées sur celle-ci, et éventuellement de leur disposition sur cette surface, ainsi qu'en fonction de la taille désirée du dispositif tel qu'il sera utilisé et des spécifications de coût. Afin d'éviter des rétentions

non souhaitables du liquide d'intérêt, entre les bordures, la surface du substrat comportant les zones de travail et leur bordure est de préférence plane. A titre d'exemple, la surface active peut avoir une forme
5 et une taille comparables à celles utilisées dans les laboratoires sur puce et les microsystèmes d'analyse et de détection connus de l'homme du métier.

Selon l'invention, on entend par « bordures » des structures en relief formées sur le substrat de manière à créer des cuvettes non jointives. Ces
10 cuvettes ne sont pas « enfoncées » dans le corps du substrat, mais sont constituées à sa surface par leur bordure. La figure 1 annexée est une représentation schématique en coupe de deux types de cuvettes : à gauche des cuvettes (c_a) de l'art antérieur,
15 « enfoncées » dans un substrat (S_a), et à droite des cuvettes (c) conformes à la présente invention, c'est à dire formées grâce à leur bordure (b) sur un substrat (S). Un espace libre reste donc disponible entre les
20 bordures des cuvettes conformes à la présente invention pour des écoulements du liquide d'intérêt. Ces bordures permettent donc chacune une capture très localisée d'une goutte (g) du liquide d'intérêt. Le terme « localisé » est défini ci-dessus. Par exemple, dans
25 une utilisation basique du dispositif, en faisant couler du liquide d'intérêt sur la surface active, de manière à couvrir ces bordures, et les cuvettes qu'elles forment, les bordures capturent, ou retiennent, une goutte de liquide d'intérêt dans la
30 cuvette, alors que la surface active, sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, ne retient

pas ou très peu de liquide d'intérêt. En cessant l'écoulement du liquide d'intérêt, seule une goutte de ce liquide est retenue localement par bordure, sur la zone de travail qu'elle entoure.

5 La forme exacte des bordures, ou muret, n'est pas définitive et peut être adaptée suivant les applications et les moyens de fabrication disponibles pour leur fabrication. Selon l'invention, les bordures peuvent avoir n'importe quelle forme à condition
10 qu'elles puissent capturer, ou emprisonner, chacune, une goutte du liquide d'intérêt, et que cette goutte soit en contact de la zone de travail entourée par ladite bordure. A titre d'exemple, les bordures peuvent avoir une section en coupe transversale, dans le sens
15 de la surface active vers la partie haute de la bordure, choisie parmi une forme triangulaire, rectangulaire, conique, tronconique, de demi-cercle, de demi-ellipse. La figure 2 représente schématiquement, en coupe transversale, différentes géométries possibles
20 de bordures (b) selon l'invention formées sur un substrat (S). A titre d'exemple également, les bordures peuvent avoir une forme, autour de leur(s) zone(s) de travail et vue du dessus, choisie parmi une forme annulaire, en étoile, en rectangle, en carré, en
25 triangle, en ellipse, ou en polygone ayant de 4 à 20 côtés. La figure 3 est une représentation schématique de bordures (b) selon l'invention, en vues du dessus, ayant différentes formes autour de leur zone de travail (Zt) qu'elles entourent.

30 Le rapport entre la hauteur des bords et le diamètre des cuvettes est un facteur de contrôle de la

bonne rétention d'une goutte de liquide d'intérêt dans les cuvettes. Lorsque les bordures sont trop élevés pour un diamètre donné, le liquide d'intérêt ne peut pas remplir les cuvettes formées par ces bordures et
5 donc être retenu. A l'opposé, lorsque la hauteur des bordures est trop faible pour un diamètre donné, le liquide d'intérêt n'est pas retenu dans les cuvettes formées par ces bordures car elles ne peuvent pas jouer leur rôle d'obstacle à l'aspiration. Ainsi, à titre
10 d'exemple, selon l'invention, les bordures se présentent avantageusement sous la forme d'anneau, éventuellement avec une des formes géométriques précitées, dont la hauteur (h) à partir de la surface active est de 5 à 20 μm ; dont la section (e) de
15 l'anneau au niveau de la surface active est de 20 à 100 μm ; et dont le diamètre (D) à l'intérieur de la bordure, délimitant la zone de travail, est de 15 μm à 5 mm.

Selon l'invention, la surface active peut aussi
20 être définie de la manière suivante (voir figure 1 à titre indicatif pour les références) :

D : diamètre intérieur des gouttes, avec, par exemple, $15\mu\text{m} \leq D \leq 5\text{mm}$;
L : espacement entre gouttes ;
25 e : section du muret la plus large, avec, par exemple, $20\mu\text{m} \leq e \leq 100\mu\text{m}$; et
h : hauteur du muret, avec, par exemple, $5\mu\text{m} \leq h \leq 20\mu\text{m}$;

30 avec $h/D < 0,15$; $e/D < 0,33$; et $h/L < 0,3$.

Les bordures sont réalisées conformément aux règles suivantes : il s'agit de structures en relief sous forme de muret définissant un périmètre fermé, avec des bords non jointifs d'une bordure à l'autre.

- 5 Ces bordures peuvent être fabriquées par tout procédé connu de l'homme du métier pour déformer les matériaux précités constituant le substrat, ou par tout procédé connu de l'homme du métier pour former sur une surface des reliefs, en particulier dans le domaine des
- 10 laboratoire sur puce et microsystemes d'analyse, par exemple par dépôt de matériau(x) et gravure. A titre d'exemple, parmi les procédés connus de l'homme du métier utilisables pour fabriquer les bordures selon la présente invention, on peut citer les suivants :
- 15 gravure directe du substrat ; dépôt d'un matériau à la surface d'un substrat plan, par exemple par couchage, évaporation, pulvérisation, ou dépôt électrochimique, puis gravure en conjonction avec un procédé classique de photolithographie, par exemple par couchage de
- 20 résine, insolation et définition de motifs, ou gravure ; définition directe de motifs par photolithographie dans des polymères photosensibles, par exemple dans le cas de résines photosensibles ; moulage ou emboutissage, par exemple de matériaux
- 25 plastiques ou du substrat formant la surface active.

- La fabrication des bordures selon l'invention, peut en particulier s'effectuer durant la dernière étape d'un empilement technologique de plusieurs couches sur le substrat. Les couches inférieures
- 30 pourront contenir des actionneurs ou des détecteurs mécaniques, optiques ou électroniques, par exemple de

type MEMS ou MEMS optique ("Micro Electro Mechanical System") ou encore des molécules greffées d'intérêt chimique ou biologique destinés à former les zones de travail. Les cuvettes peuvent par exemple être
5 disposées sur un damier, à la surface du substrat, de telle sorte qu'elles ne possèdent aucun bord en commun.

Selon l'invention, optionnellement, les bordures peuvent être mouillantes vis à vis de le liquide d'intérêt sur leur partie la plus haute par
10 rapport à la surface active et/ou sur leur versant en regard avec la zone de travail qu'elle entoure. Cette option permet de renforcer, si nécessaire, la rétention de la goutte de liquide d'intérêt capturée par la bordure. Cette mouillabilité peut être obtenue, par
15 exemple sur des bordures constituées de silicium, d'oxyde de silicium (SiO_2), de verre, de nitrure de silicium (Si_3N_4), c'est à dire de matériaux pouvant constituer le substrat, par greffage sur ce matériau d'une fonction chimique mouillante vis-à-vis du liquide
20 d'intérêt auquel est destiné le dispositif de l'invention. Par exemple, la fonction chimique mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux peut être choisie dans le groupe constitué d'une fonction alcool, alcoolate, acide carboxylique, carboxylate,
25 acide sulfonique, sulfonate, oxyamine, hydrazine, amine et ammonium.

Cette mouillabilité peut aussi être obtenue, lorsque le substrat est à base de silicium, par gravure pour former du silicium noir oxydé
30 hydrophile qui ne nécessitera pas de modification chimique pour être mouillant vis-à-vis des solutions

aqueuses. Ce mode de réalisation économique est donc préférentiellement utilisé lorsque le liquide d'intérêt est aqueux. Le document [10] présente un protocole utilisable pour exécuter ce mode de réalisation.

5 La nature de la surface, à l'extérieur des cuvettes, mais aussi avantageusement à l'intérieur des cuvettes, est un paramètre important pour permettre le bon fonctionnement global du dispositif de la présente invention. Le traitement de la surface du substrat pour
10 le rendre sensiblement non mouillant peut être effectué avant ou après la formation des cuvettes, afin de modifier l'affinité des zones sur le substrat : entre les cuvettes et, avantageusement, en leur centre. Ainsi, l'aspiration du liquide d'intérêt est facilitée
15 par une faible affinité entre le liquide d'intérêt et la surface entre les cuvettes. D'autre part, le centre des cuvettes peut avantageusement posséder une bonne affinité vis-à-vis de la phase liquide pour faciliter la capture d'une goutte de liquide d'intérêt au sein
20 des cuvettes.

De manière tout à fait inattendue, les inventeurs ont remarqué que lorsque toute la surface du substrat, c'est à dire le centre des cuvettes formées par les bordures et la surface entre les cuvettes,
25 possède une mauvaise affinité avec le liquide d'intérêt, notamment lorsqu'elle est sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, la capture de la phase liquide dans les cuvettes lors de l'aspiration peut tout de même s'effectuer grâce à la
30 présence des parois des cuvettes conformes à la présente invention, même si elles sont non mouillantes

vis-à-vis du liquide d'intérêt. Ainsi, selon l'invention, les zones de travail peuvent être des zones non mouillantes vis-à-vis du liquide d'intérêt. Un autre avantage de cette invention est que la capture
5 du liquide d'intérêt dépend beaucoup moins de l'état de la surface ou de son évolution dans le temps que pour les dispositifs de l'art antérieur. En effet, si l'affinité entre le centre de la cuvette et le liquide d'intérêt diminue au cours du temps, la capture reste
10 assurée par la présence des bordures, ou murets conformes à la présente invention.

De préférence, selon l'invention, au moins une zone de travail est dans le même plan que la surface active, de préférence encore, toutes les zones de
15 travail de la surface active. Les bordures étant réalisées autour des zones de travail, la fabrication du dispositif de la présente intention est ainsi facilitée.

Par zone de travail, on entend dans la présente
20 invention une zone au niveau de laquelle des opérations physiques et/ou chimiques et/ou optiques peuvent être menées dans la goutte capturée par la bordure qui l'entoure (sa bordure). Ainsi, selon l'invention, au moins une zone de travail peut être une zone
25 d'interaction choisie parmi une zone d'interaction électrique, chimique, mécanique, optique avec ladite goutte de liquide d'intérêt capturée, ou une zone au niveau de laquelle plusieurs de ces interactions sont utilisées simultanément ou successivement.

30 Ainsi, suivant une première forme de réalisation de l'invention, au moins une zone de

travail peut être une zone d'interaction électrique, par exemple une microcellule électrochimique. Une microcellule électrochimique est un dispositif possédant au moins deux électrodes, préférentiellement
5 coplanaires, formant une électrode de travail et une contre-électrode. Elle peut également posséder une électrode de référence. Ces éléments sont connus de l'homme du métier et les procédés de fabrication connus de l'homme du métier sont utilisables pour fabriquer
10 cette zone de travail, par exemple le procédé décrit dans le document référencé [7].

Grâce à cette forme de réalisation, le dispositif de la présente invention peut constituer un véritable microréacteur électrochimique qui utilise les
15 gouttes de liquide d'intérêt capturées par les bordures comme milieux réactionnels, et plus précisément comme milieux électrochimiques. Chaque réacteur électrochimique (bordure + zone de travail sous forme de microcellule électrochimique + goutte de liquide
20 d'intérêt capturée) suivant cette première forme de réalisation de la présente invention peut être utilisé pour réaliser toute réaction et/ou analyse électrochimique connue de l'homme du métier.

Ce réacteur peut servir par exemple à effectuer
25 des réactions d'électropolymérisation localisée d'un ou de plusieurs monomère(s) présent(s) dans la goutte (polymérisation ou copolymérisation) et/ou d'électrogreffage localisé d'une ou de plusieurs molécule(s) chimique(s) présente(s) dans la goutte du liquide
30 d'intérêt sur une des électrodes de la microcellule. Dans cet exemple, le liquide d'intérêt peut être un

liquide contenant les réactifs nécessaires à l'électropolymérisation ou à l'électrogreffage désiré. La polymérisation et le greffage sont alors avantageusement localisés au niveau de la goutte du
5 liquide d'intérêt capturée par la bordure. De telles réactions d'électropolymérisation ou greffage localisés peuvent être utilisées par exemple pour la fabrication de puces biologiques ou systèmes d'analyse.

Dans un exemple particulier, la microcellule
10 électrochimique du dispositif de l'invention peut être utilisée d'abord pour « fabriquer » les zones de travail, et ensuite, par exemple pour utiliser ces zones de travail pour l'analyse des gouttes d'un liquide d'intérêt à analyser. Par exemple, si les zones
15 de travail doivent comprendre un polymère organique fonctionnalisé par une sonde, par exemple une sonde biologique, elles peuvent être fabriquées par électropolymérisation d'un polymère conducteur fonctionnalisé par une sonde, par exemple suivant le
20 procédé décrit dans le document référencé [5]. La particularité liée à l'utilisation du dispositif de l'invention est qu'on utilise les bordures pour capturer de manière localisée sur chaque zone de travail une première goutte d'un premier liquide
25 d'intérêt contenant les réactifs nécessaires à l'électropolymérisation (monomère organique). La fonctionnalisation par la sonde, peut être réalisée simultanément à l'électropolymérisation, le premier liquide d'intérêt contient alors aussi la sonde (par
30 exemple monomère fonctionnalisé par la sonde). La fonctionnalisation peut aussi être réalisée

postérieurement à l'électropolymérisation au moyen d'une deuxième goutte d'un deuxième liquide d'intérêt (contenant la sonde) capturée par les mêmes bordures et, de ce fait localisée sur les mêmes zones de travail. En outre, les zones de travail ainsi fabriquées peuvent ensuite être séchées, et elles peuvent servir, toujours grâce à leur bordure qui les entoure, à capturer une goutte d'un troisième liquide d'intérêt à analyser, contenant une cible qui interagit avec la sonde (par exemple oligonucléotides complémentaires). Un quatrième liquide d'intérêt peut encore être utilisé pour analyser (détection et/ou dosage) l'interaction sonde/cible sur lesdites zones de travail, et ainsi de suite.

Le microréacteur électrochimique selon l'invention peut servir par exemple aussi à effectuer des analyses électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'analytes présents dans les gouttes capturée par les bordures. Il peut servir par exemple aussi à effectuer des analyses électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'une interaction moléculaire sonde/cible, la sonde étant fixée sur les zones de travail, et la cible se trouvant dans les gouttes du liquide d'intérêt capturées.

Dans un exemple particulier, où la microcellule électrochimique d'un dispositif de la présente invention est utilisée pour détecter une cible présente dans un échantillon liquide, par exemple en mettant en jeu une interaction de la cible à détecter avec une sonde spécifique fixée sur les zones de travail, il est possible de détecter électrochimiquement ladite

interaction par exemple avec amplification du signal par accumulation enzymatique dans une goutte d'un liquide d'intérêt, contenant un substrat enzymatique, capturée par la bordure qui entoure chaque zone de travail. Le document [4] expose un protocole opératoire utilisable pour ce type de détection, avec le dispositif de la présente invention.

La détection d'une interaction sonde/cible sur une zone de travail peut faire intervenir un des autres moyens connus de l'homme du métier que la cellule électrochimique, par exemple un de ceux exposés dans la présente description, par exemple un procédé optique. La microcellule électrochimique peut donc servir dans ce cas uniquement à « fabriquer » les zones de travail, la détection d'une interaction sonde/cible étant ensuite effectuée par un autre moyen, ou alors à analyser une interaction sonde/cible, la fabrication des zones de travail étant réalisée par un autre procédé, par exemple un de ceux connus de l'homme du métier dans le domaine des puces biologiques.

Quelle que soit la mise en œuvre de cette forme de réalisation caractérisée par la présence d'une microcellule électrochimique, lorsqu'une sonde est utilisée sur les zones de travail, elle peut être choisie par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, polynucléotide, polynucléoside, ADN complémentaire, ou

Elles peuvent descendre en dessous du cm pour leur côté le plus grand.

La boîte peut être constituée par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué par un polymère organique, une matière plastique élastomère, un verre, du métal, du silicium, une résine photosensible, ou par tout matériau connu de l'homme du métier et permettant la mise en œuvre de la présente invention. Par exemple, il peut s'agir d'un polymère choisi dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines.

Le matériau de la boîte est généralement choisi en fonction de la nature du liquide d'intérêt à introduire dans la boîte, de l'utilisation de la boîte (simplement couverture du substrat par le liquide d'intérêt pour former la matrice de gouttes ou couverture et analyses ou autre (réactions chimiques, électrochimiques ou biochimiques) et en fonction des spécifications de coût du fabriquant. Il peut s'agir d'un matériau identique au substrat du dispositif de l'invention ou différent.

La boîte est de préférence suffisamment étanche pour éviter par exemple les fuites lors de l'introduction dans celle-ci du liquide d'intérêt et/ou les contaminations pouvant provenir de l'extérieur de la boîte, par exemple bactérienne, chimiques, etc. et/ou l'évaporation des gouttes capturées par les bordures entourant les zones de travail du dispositif de la présente invention.

Selon un mode de réalisation particulier de la boîte, lorsque le substrat et la boîte sont constitués d'un même matériau, le substrat peut constituer une des parois de la boîte, la surface active étant dirigée
5 vers l'intérieur de la boîte.

Les parois de la boîte peuvent être montées à partir de, et sur, la surface active du dispositif de l'invention, par exemple par collage ou compression.

La boîte de travail peut comprendre un capot
10 pour son montage, mais aussi, dans certaines applications, pour l'ouvrir ou la fermer, notamment afin de pouvoir retirer de celle-ci le substrat de l'invention avec sa surface active après l'avoir mis en contact avec le liquide d'intérêt, ou après les
15 analyses ou réactions dans les gouttes. En effet, une seule boîte peut également servir pour immerger en même temps ou successivement un, ou, suivant sa conception, plusieurs substrats selon l'invention. La boîte peut alors comprendre des moyens de fixation amovibles, par
20 exemple des clips, du, ou des, substrats à l'intérieur de celle-ci. Si la boîte comprend un capot, il est de préférence suffisamment étanche pour ne pas perturber l'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte.

Le capot peut être constitué d'un matériau tel
25 que ceux précités pour la boîte. Il peut être fabriqué par exemple par moulage, par emboutissage, par gravure ou par érosion mécanique, etc. Il peut ensuite être fixé définitivement sur la boîte pour la fermer, par exemple par collage, compression, plaquage ou par tout
30 autre moyen connu de l'homme du métier et assurant la tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de

celle-ci. Il peut aussi être fixé sur la boîte de manière amovible, toujours en assurant la tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de celui-ci, afin que la même boîte ainsi constituée puisse servir à
5 disposer des matrices de gouttes sur plusieurs substrats différents selon l'invention, et/ou avec différents liquides d'intérêt.

De préférence, le matériau de la boîte, et, le cas échéant, de son capot, est, à l'intérieur de celle-ci, sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt. En effet, ceci permet d'éviter que des gouttes adhèrent aux surfaces internes de la boîte, après l'extraction du liquide d'intérêt, et retombent sur la surface active et viennent gêner les analyses et
10 réactions sur les zones de travail dans les gouttes capturées par les bordures. Des traitements de surface peuvent être nécessaires pour obtenir ce résultat, comme pour la surface active du dispositif de l'invention. Ces traitements peuvent être par exemple
15 ceux précités pour la fabrication de la surface active.

La boîte de la présente invention peut être munie de moyens d'introduction du liquide d'intérêt dans ladite boîte et d'extraction de liquide d'intérêt de ladite boîte. Ces moyens peuvent comprendre par
25 exemple deux ouvertures. Il n'y a pas de limitation dans la position, la forme, le nombre, et la fonction de ces ouvertures autres que celles-ci : elles doivent permettre l'introduction puis l'extraction du liquide d'intérêt de la boîte, et elles doivent être disposées
30 de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans la boîte, il couvre la ou les bordures

de la surface active, et lorsque le liquide d'intérêt est extrait de la boîte, une goutte du liquide d'intérêt reste captive par bordure. Le liquide d'intérêt peut entrer puis sortir de la boîte par deux
5 ouvertures différentes. Il peut aussi entrer puis sortir de la boîte par une seule de deux ouvertures, une deuxième ouverture servant à autoriser l'extraction du liquide d'intérêt, soit en laissant passer l'air appelé par l'extraction du liquide d'intérêt, soit en
10 injectant par cette deuxième ouverture un fluide gazeux permettant de pousser le liquide d'intérêt hors de la boîte.

Les moyens d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte comprennent notamment des
15 ouvertures qui peuvent être disposées sur le capot ou sur les parois de la boîte, par exemple par gravure, emboutissage, moulage, exposition à la lumière pour une résine photosensible, perçage mécanique, etc.

Les moyens d'introduction du liquide d'intérêt
20 dans la boîte peuvent comprendre tout moyen approprié connu de l'homme du métier pour injecter un liquide dans une boîte, notamment ceux utilisés dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes. Ces moyens d'introduction peuvent être choisis par exemple
25 parmi une seringue, une pipette, une micropipette, ou une pompe d'injection, etc.

Les moyens d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte peuvent comprendre tout moyen approprié connu de l'homme du métier pour extraire un liquide d'une
30 boîte, notamment ceux utilisés dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes. Ces moyens

d'extraction peuvent être par exemple une pompe d'extraction, manuelle ou automatique.

Par exemple, selon l'invention, lorsque le moyen d'extraction du liquide d'intérêt comprend une pompe d'extraction, celle-ci peut être sous la forme d'une pompe d'injection d'un fluide gazeux dans la boîte, par une première ouverture formée sur la boîte, de manière à pouvoir injecter dans la boîte un fluide gazeux chassant le liquide d'intérêt de la boîte par une deuxième ouverture formée sur la boîte. Avantageusement, la pompe d'injection du fluide gazeux comprend en outre un dispositif de saturation du fluide gazeux injecté en vapeur du liquide d'intérêt. Cette saturation permet d'éviter ou de limiter l'évaporation de la, ou des, goutte(s) capturée(s) par les bordures.

Par exemple aussi, lorsque le moyen d'extraction comprend une pompe aspirante, celle-ci peut être sous la forme d'une pompe aspirante disposée au niveau d'une ouverture formée sur la boîte de manière à pouvoir extraire le liquide d'intérêt de la boîte en l'aspirant par cette ouverture. Avantageusement, une deuxième ouverture peut être aménagée sur la boîte de manière à permettre l'introduction d'un fluide gazeux, par exemple de l'air, un gaz neutre, ou un fluide gazeux saturé en vapeur du liquide d'intérêt, par l'appel d'air provoqué par l'aspiration du liquide d'intérêt.

La présente invention se rapporte également à un procédé de fabrication d'un dispositif selon l'invention, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- fournir un substrat
- former des zones de travail sur ledit substrat,
- structurer la surface du substrat de manière à former une bordure autour des zones de travail,
- traiter la surface sur laquelle les zones de travail et leur bordure ont été formées pour la rendre sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt,
- fournir une boîte et y introduire le substrat comprenant les zones de travail entourées par leur bordure, ladite boîte comprenant des moyens pour introduire le liquide d'intérêt dans la boîte et des moyens pour extraire le liquide d'intérêt de la boîte, et
- fermer ladite boîte.

Le substrat, la formation des zones de travail, la structuration de la surface destinée à former les bordures autour des zones de travail, le traitement de la surface du substrat destiné à la rendre sensiblement non mouillante, sont déjà définis ci-dessus.

Il est bien entendu, au vu de la présente description, que le procédé de l'invention inclut la formation simultanée ou successive de plusieurs zones de travail et bordures respectives autour de celles-ci.

Les différents matériaux et étapes de ce procédé ont déjà été décrits ci-dessus.

Le déroulement du procédé permettant la capture d'une goutte du liquide d'intérêt par cuvette formée

par une bordure, sur la surface active dans la boîte de travail, peut être schématisé de la manière suivante :

- remplissage total ou partiel de la boîte, ou chambre fluide, par le liquide d'intérêt de manière à couvrir la ou les zone(s) de capture, puis
- extraction du liquide d'intérêt de la boîte.

Seule(s) la ou les zones de capture retiennent chacune une goutte du liquide d'intérêt, la surface active étant non mouillante. Plus aucun appareillage coûteux de dispense de gouttes n'est nécessaire. De plus, le nombre de zones de travail n'est plus limité par les limites de ces appareils.

Les inventeurs de la présente invention ont également remarqué que, de manière surprenante, l'extraction du liquide d'intérêt s'effectue plus facilement que sur un substrat de l'art antérieur où les bords des cuvettes - qui n'en sont pas réellement car la surface de ces substrats est creusée pour former les cuvettes, mais aucune bordure n'est formée au sens de la présente invention - sont jointifs, car les zones dégagées entre les cuvettes forment autant de canaux pour l'écoulement d'un fluide. D'autre part, la disposition particulière des zones de travail et bordures de la présente invention, conjuguée à la fabrication en relief sur la surface, permet d'éviter toute communication du liquide d'une cuvette à une autre, une fois l'aspiration effectuée.

L'utilisation du dispositif de la présente invention est très souple, car il est possible de faire intervenir successivement une opération qui se déroule

collectivement, puis des opérations individuelles au niveau de chacune des gouttes formées. Ainsi, dans une première opération, dite collective, le dispositif de l'invention permet le passage d'une veine fluidique du liquide d'intérêt, par exemple injectée dans ladite
5 boîte, à une matrice de gouttes, ou micro-volumes, indépendantes les unes des autres. Ensuite, des procédés de détection et/ou de réactions chimiques ou biochimiques connues de l'homme du métier peuvent être
10 mis en oeuvre individuellement (opération individuelle), en parallèle, ou successivement, dans chacune des gouttes capturées par les bordures pour détecter et analyser des cibles présentes dans le liquide d'intérêt.

15 Dans des procédés à plusieurs étapes utilisant le dispositif de l'invention, il n'est pas nécessaire que toutes les étapes conduisent à la formation de gouttes. En effet, rien n'empêche que certaines étapes soient réalisées en couvrant la totalité des bordures
20 par un liquide puis en vidant la boîte de ce liquide de telle manière qu'il ne reste pas de gouttes captives par les bordures, par exemple par injection dans la boîte d'un gaz sous pression, par agitation énergique, etc.

25 Il est par ailleurs possible de capturer successivement différentes gouttes d'un ou de plusieurs liquides d'intérêt sur une même zone de travail grâce à la bordure qui l'entoure. Chaque liquide d'intérêt peut contenir un ou plusieurs réactif(s) nécessaire(s) par
30 exemple pour réaliser une des étapes d'un procédé de chimie ou biochimie, par exemple pour fabriquer les

zones de travail et/ou ou pour effectuer des analyses. La succession des différentes gouttes sur une même zone de travail permet par exemple de réaliser différentes étapes successives d'un procédé mis en œuvre sur le
5 dispositif de l'invention, et, plus particulièrement sur les zones de travail entourées par leur bordure. L'ensemble de ces étapes de procédé est donc avantageusement localisé sur les zones de travail grâce à leur bordure.

10

Dans des expérimentations liées à la mise en œuvre de la présente invention, les inventeurs ont noté que le dispositif de l'invention résout encore d'autres problèmes techniques, par rapport aux techniques de
15 l'art antérieur, dans le domaines des laboratoires sur puce, puces biologiques et microsystèmes. En particulier, il existe dans l'art antérieur un certain nombre de méthodes de greffage covalent localisé de molécules biologiques pour fonctionnaliser des surfaces
20 de puce biologique. Cette localisation est en général réalisée par voie chimique, photochimique ou bien électrique. Par voie chimique, l'immobilisation d'un élément biologique (sonde) se fait par dépôt localisé (« spotting ») ou synthèse in situ ce qui est
25 contraignant en termes de temps. Par voie photochimique, il est possible de réaliser des synthèses d'oligonucléotides à l'aide de groupements photolabiles [4] : Ici encore, des limitations en termes de temps de synthèse et de volumes de réactifs coûteux
30 sont souvent rencontrées. De plus, des réactions radicalaires non sélectives peuvent avoir lieu. Par

voie électrique, la synthèse d'oligonucléotides sur support solide avec groupement électro-labile rencontre les mêmes limitations. Par voie électrochimique [3], par copolymérisation de pyrrole et de pyrrole porteur d'une
5 espèce biologique sur une électrode métallique. Cette dernière technique présente l'inconvénient de requérir des volumes importants de réactifs coûteux (pyrrole porteur de l'espèce biologique).

Le dispositif de la présente invention permet
10 de résoudre ces nombreux problèmes de l'art antérieur. En effet, il permet de fonctionnaliser rapidement et précisément des surfaces de puces biologiques, qui sont devenues dans la présente invention les zones de travail, grâce à une localisation rapide et précise de
15 chaque goutte du liquide d'intérêt sur la ou les zone(s) de travail, et un contrôle précis des densités de sondes immobilisées. En outre, par rapport aux procédés de l'art antérieur, les volumes de réactifs utilisés sont nettement moins importants du fait de la
20 localisation précise de la réaction dans le volume des gouttes de réactifs capturées par les zones de capture. En outre, les expérimentations des inventeurs ont montré que le dispositif de la présente invention permet de travailler en micro-volumes indépendants les
25 uns des autres, sans contamination croisée entre les plots de détection, ce qui augmente considérablement la précision et la reproductibilité des analyses.

Ainsi, la présente invention permet entre autre une mesure électrochimique ou optique en milieu
30 confiné, dans les gouttes capturées par les bordures, mais également une fonctionnalisation localisée sur la

zone de travail par voie électrochimique ou chimique avec des réactifs coûteux : le volume des réactifs est réduit à la vraie zone utile formée par chaque zone de travail entourée par sa bordure selon l'invention.

5 Cette invention trouve actuellement son plus grand intérêt dans les applications laboratoire sur puce et microsystèmes. La présente invention se rapporte donc également à une puce biologique, par exemple choisie dans le groupe constitué des puces à
10 acide nucléique, des puces à anticorps, des puces à antigènes, des puces à protéine et des puces à cellules.

 Selon l'invention, des détections de différentes molécules susceptibles d'être présentes
15 dans le liquide d'intérêt peuvent être réalisées en parallèle, simultanément ou successivement, dans différentes gouttes de liquide d'intérêt captives sur ladite surface active dans la boîte.

 Selon l'invention, le, au moins un, analyte à
20 détecter peut être choisi par exemple parmi les molécules biologique ou chimique. Les molécules biologiques peuvent être choisies par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine,
25 un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un virus, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, un nucléotide, un nucléoside, un ADN complémentaire. La molécule chimique
30 peut être toute molécule qui doit être analysée qualitativement et/ou quantitativement.

D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre illustratif et non limitatif en référence aux figures annexées.

Brève description des figures

- La figure 1 est une représentation schématique en coupe de deux types de cuvettes : à gauche les cuvettes de l'art antérieur, et à droite les cuvettes conformes à la présente invention.

- La figure 2 est une représentation schématique en coupe de différentes formes géométriques de bordures conformes à la présente invention.

- La figure 3 est une représentation schématique de bordures selon l'invention, en vues du dessus, ayant différentes formes autour des zones de travail respectives qu'elles entourent.

- La figure 4 est un schéma représentant en coupe transversale un dispositif conforme à la présente invention et son fonctionnement pour la création d'une matrice de gouttes grâce à la surface active de son substrat.

- La figure 5 est un schéma représentant en coupe transversale un dispositif conforme à la présente invention dans lequel les moyens d'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte et d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte utilisent une même ouverture de la boîte.

- La figure 6 est un schéma en vue du dessus, réalisé à partir de photographies expérimentales, d'une

surface active selon l'invention montrant la formation d'une matrice de gouttes : à gauche la surface sans gouttes avant que le liquide d'intérêt soit introduit dans le dispositif de la présente invention, et à
5 droite, la surface avec la matrice de gouttes retenue par les bordures (b) lorsque le liquide d'intérêt a été extrait de la boîte.

- La figure 7 est une photographie d'un mode de réalisation du dispositif de l'invention dans lequel
10 une bordure de résine entoure chaque zone de travail, et dans lequel les zones de travail sont des microcellules électrochimiques. Le diamètre extérieur de la couronne de résine entourant la cellule électrochimique du dispositif photographié est dans la
15 réalité de 700µm.

- La figure 8 est un graphique de courbes de voltamétrie cyclique mesurant l'intensité ($I(\mu A)$) en fonction du potentiel (mV) avant (Av) la formation d'une matrice de gouttes et après (Ap) la formation
20 d'une matrice de gouttes sur un dispositif conforme à la présente invention dont la surface active est représentée en agrandissement sur la figure 7.

- La figure 9 est une représentation schématique de différents modes de réalisations
25 possibles d'une boîte de travail selon l'invention, en particulier elle représente des exemples de dispositions des moyens d'introduction et d'extraction de liquide d'intérêt de la boîte sur différentes boîtes de travail conformes à la présente invention.

EXEMPLES**Exemple 1 : Fabrication de zones de capture constituées de bordures**

Sur une plaque neuve de silicium est effectuée
5 une étape de photolithographie avec une résine épaisse
photosensible Clariant AZ4562 (marque de commerce) de
la manière suivante :

- dépôt d'un promoteur d'adhérence, qui est ici
de l'hexaméthylènedisilazane, en four à 120°C,
- 10 - couchage de résine sur tournette à
1000 tour/minute pendant 30 s avec une
accélération de 200 tours/minute/s,
- recuit sur plaque chauffante 115°C pendant 2
minutes,
- 15 - insolation sur machine d'insolation Karl Süss
MA750 (marque de commerce) pendant 50 s en mode
discontinu (5x10 secondes avec 5 secondes de
pause) à travers un masque,
- développement dans une solution Shipley MF319
20 (marque de commerce) diluée dans les
proportions 1:3 avec de l'eau désionisée,
- rinçage à l'eau désionisée et séchage sous flux
d'azote,
- recuit sur plaque chauffante à 115°C pendant 3
25 minutes, puis à 150°C pendant 1 minute,
- mesure d'épaisseur : 13 µm.

Sur le masque utilisé pour l'insolation, tous
les motifs représentent des anneaux dont les murets ont
30 une largeur de 35 µm avec des combinaisons variées

entre leur diamètre (100 à 1000 μm) et la distance inter-centre entre deux couronnes (50 à 1000 μm).

3025 cuvettes sur une surface de 1 centimètre carré ont pu être obtenues aisément.

5

Exemple 2 : Fabrication de la boîte

Un capot creux en polydiméthylsiloxane (PDMS) est fabriqué par moulage sur un moule en verre avec un motif carré en surépaisseur de 1 mm. Sur un dispositif
10 plan comme ceux obtenus dans l'exemple précédent, ce capot creux est fixé de manière hermétique par collage avec de la colle réticulant par insolation aux rayons ultraviolets (VITRALIT 6181). Les connexions pour les entrées et sorties des fluides sont réalisées par
15 perçage du capot avec des aiguilles de faible diamètre. L'aiguille d'entrée est reliée à des tubes de transport de fluide et à une seringue pleine du liquide d'intérêt. L'ensemble final est testé pour les fuites, sachant que le liquide doit passer uniquement par les
20 connexions prévues à cet effet.

La figure 4 est une représentation schématique de la boîte obtenue dans cet exemple. D'autres dispositions des connexions d'entrée et de sortie (o, s) d'introduction et d'extraction d'un liquide
25 d'intérêt peuvent facilement être réalisées suivant cet exemple, et la figure 9 représente schématiques des boîtes pouvant être obtenues.

Sur la figure 4 annexée, la boîte (B) selon l'invention comporte des ouvertures (o, s). Les zones
30 de travail (Zt) et bordures (b) sont également représentées.

Exemple 3 : Capture d'eau désionisée sur une surface de silicium avec oxyde natif

Différents types de motifs formant des bordures
5 selon l'invention, représentés sur les figures 1 à 3 annexées, et obtenus par le procédé décrit dans l'exemple 1, sont testés avec de l'eau désionisée (EDI).

Pour cela, des capots avec une veine fluidique
10 d'épaisseur voisine de 1 mm constituée grâce à une boîte de travail selon l'invention, fabriquée suivant l'exemple 2 (figure 4 annexée) sont utilisés pour permettre l'injection puis l'aspiration d'EDI, via des tubes en plastique.

15 La surface initiale, constituée de silicium avec une couche d'oxyde natif n'a pas été traitée et l'angle de contact est voisin de 68° avec de l'EDI.

Comme le montre la figure 6 annexée, à droite, l'EDI reste retenue dans les cuvettes formée par les
20 bord (b), sur la zone de travail (Zt), sous forme de gouttes (g) après aspiration du liquide d'intérêt.

Différents modes de remplissage de la boîte par le liquide d'intérêt ont été testés : avec introduction et extraction du liquide d'intérêt par la même
25 ouverture (figure 5 annexée), et introduction par une ouverture et extraction par une autre ouverture (figure 4). Une matrice de gouttes est obtenue à chaque fois.

En outre, il a été noté que le remplissage de la boîte n'est pas obligatoire, l'essentiel est que les
30 bordures soient recouvertes par le liquide d'intérêt.

Cet exemple montre qu'une matrice de gouttes (g) bien localisées sur les zones de travail est obtenue grâce à ce dispositif conforme à la présente invention. La présente invention répond donc à
5 l'ensemble des besoins précités de l'art antérieur.

Exemple 4 : fabrication de zones de travail fonctionnalisées par une sonde selon l'invention

Un empilement technologique utilisant des
10 techniques courantes de microélectronique permet de former des électrodes sur une plaque de silicium par dépôt de métal puis photolithographie puis gravure localisée.

Dans cet exemple, une microcellule comprenant
15 trois électrodes est fabriquée et utilisée. Sur un substrat de Si avec une couche de SiO₂ de 300 nm, réalisation d'étapes standards pour l'homme du métier de la microélectronique :

- dépôt de 300 nm de platine (Pt) par
20 pulvérisation ;
- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture des motifs de la microcellule et des bandes d'arrivée de courants ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique
25 complète du Pt dans les zones sans résine ;
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique ;
- dans un réacteur à plasma, dépôt chimique en phase vapeur de 500nm de SiO₂ ;

- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture des motifs des électrodes de la microcellule ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète de 500nm de SiO₂ dans les zones sans résine ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

10 L'électrode de travail (We) et la contre-électrode (CE) sont en platine (dépôt 5000 Å environ) (voir figure 7).

Une électrode de référence Ag/AgCl/Cl⁻ (Rf) est également présente. Cette électrode est obtenue par dépôt d'argent sur le platine avec le protocole

15 suivant :

- préparation de 10 ml de solution contenant AgNO₃ 0,2 M, KI 2 M, Na₂S₂O₃ 0,5 mM.
 - potentiel de -0,65 V vs ECS (électrode au calomel saturé) est imposé pendant 90 secondes (suivi par chronoampérométrie) sur l'électrode de référence.
- Un dépôt gris/blanc est obtenu. Le substrat est ensuite rincé à l'eau.

- Le substrat avec l'électrode modifiée précédemment est plongé dans une solution de HCl 0,1 M et on impose un potentiel de 0,5 V vs ECS pendant 30 secondes pour chlorer le dépôt d'argent. Le substrat est ensuite rincé à l'eau.

Une étape de photolithographie identique à celle décrite dans l'exemple 1 est ensuite réalisée

30 afin d'entourer ces électrodes obtenues précédemment

d'un bourrelet de résine épaisse de marque de commerce Clariant AZ4562 et créer des cuvettes de 500 μm de diamètre, avec des murets de 13 μm de haut et 25 μm de largeur.

5 Une des bordures (b) obtenues est représentée en entier sur la photographie de la figure 7 annexée. Elle entoure bien la microcellule électrochimique (CE, We, Rf).

10 Le substrat est finalement silanisé avec un silane hydrophobe (octadécyltrichlorosilane) selon le procédé suivant : le substrat est tout d'abord traité pour générer les sites silanols dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (marque de commerce) (Société Plassys, France) dans les conditions suivantes :
15 puissance 400W, temps de réaction 2 minutes, pression de 21,33 Pa (160 mTorrs), débit d'oxygène 25cm³/min., à température ambiante. Le substrat est ensuite placé pendant 10 minutes à température ambiante dans un mélange heptane anhydre / silane hydrophobe à 9mM en
20 concentration de silane. Il est ensuite lavé avec de l'heptane, puis du toluène, puis de l'eau. Le substrat est ensuite placé dans une étuve pendant 1 heure à 110°C. L'angle de contact mesuré avec l'eau est voisin de 100°C.

25

Exemple 5 : Utilisation d'un dispositif selon l'invention pour une mesure électrochimique avec une solution de Fe²⁺

30 La cellule électrochimique entourée de sa bordure obtenue dans l'exemple 4 est testée en utilisant la boîte fabriquée dans l'exemple 2, et une

solution contenant des ions ferreux (Fe II) est introduite dans la veine fluide formée par cette boîte.

La figure 8 est un graphique de courbes de voltamétrie cyclique mesurant l'intensité ($I(\mu\text{A})$) en fonction du potentiel (mV) avant la formation de la matrice de gouttes et après la formation de la matrice de gouttes sur un dispositif conforme à la présente invention représenté sur la figure 7.

Une première mesure est effectuée en voltamétrie cyclique, montrant la vague d'oxydation des ions ferreux. La solution est ensuite aspirée de la boîte pour ne laisser que les cuvettes remplies chacune par une goutte du liquide d'intérêt. Une seconde mesure électrochimique, identique à la première, est réalisée, montrant de nouveau la présence de la réaction d'oxydation du fer.

Le liquide d'intérêt est donc bien retenu dans les cuvettes, autorisant une mesure après aspiration et vidange de la chambre fluide formée par la boîte de travail de la présente invention.

Le remplissage de la boîte n'est pas obligatoire, l'essentiel est que les bordures soient recouvertes par le liquide d'intérêt.

Cet exemple montre qu'une matrice de gouttes (g) bien localisées sur les zones de travail est obtenue grâce à ce dispositif conforme à la présente invention. La présente invention répond donc à l'ensemble des besoins précités de l'art antérieur.

Liste des références

- [1] WO 02/16023: Protogene Laboratories Inc.
- [2] US 6,040,193: Affymetrix Inc.
- 5 [3] WO 99/03684 : Eapen Saji et col.
- [4] Azek et al., *Analytical Biochemistry*, 2000, **284**, 107-113.
- [5] WO 00/36145 : Commissariat à l'Energie Atomique.
- 10 [6] WO 02/090573 : Infineon
- [7] J. Cooper et al., "Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes", *Anal. Chem.* **1997**, 69, 253-258.
- [8] FR-A-2 818 662
- 15 [9] EP 561 722
- [10] H. Jansen et al., "The black silicon method : a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", *J. Micromech. Microeng.* 5 (1995), 115-120.
- 20

REVENDICATIONS

1. Dispositif (1) de travail comprenant :
- une boîte (Bo) de travail munie de moyens
5 d'introduction d'un liquide d'intérêt (E) dans la boîte
et de moyens d'extraction (o,s) du liquide d'intérêt de
la boîte,
 - un substrat (S) comportant une surface
active sensiblement non mouillante vis-à-vis dudit
10 liquide d'intérêt enfermée dans ladite boîte,
 - plusieurs zones de travail (Zt) formées sur
ladite surface active de manière distincte et entourées
chacune par une bordure (b) formée sur ladite surface
active sensiblement non mouillante vis à vis du liquide
15 d'intérêt, les bordures ne se touchant pas entre elles
et n'ayant pas de bord commun,
- dans lequel les moyens d'introduction et
d'extraction (o,s) du liquide d'intérêt de la boîte
sont disposées sur ladite boîte de travail de telle
20 manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit
dans la boîte (Bo), il couvre les zones de travail et
leur bordure respective, et
- dans lequel les bordures ont une géométrie
telle que lorsque le liquide d'intérêt est extrait de
25 la boîte, après y avoir été introduit, une goutte (g)
du liquide d'intérêt (E) reste prisonnière par chaque
bordure (b) et en contact de la zone de travail (Zt)
qu'elle entoure.

2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de travail est dans le même plan que la surface active.

5 3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone d'interaction électrique et/ou chimique avec la goutte capturée par sa bordure.

10 4. Dispositif selon la revendication 3, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une microcellule électrochimique.

15 5. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de travail est un capteur choisi dans le groupe constitué d'un capteur optique, électrique, magnétique, électrostatique, mécanique, thermique ou chimique.

20 6. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de travail est un actionneur choisi dans le groupe constitué d'un actionneur optique, électrique, magnétique, électrostatique, mécanique, thermique ou chimique.

25 7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone de détection d'au moins une espèce chimique ou biologique susceptible d'être
30 présente dans la goutte du liquide d'intérêt lorsqu'elle est capturée.

8. Dispositif selon la revendication 7, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone fonctionnalisée par une sonde destinée à interagir avec
5 une cible susceptible d'être présente dans la goutte du liquide d'intérêt lorsqu'elle est capturée.

9. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel la sonde est choisie dans le groupe constitué
10 par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un
15 organisme vivant, un polynucléotide, un polynucléoside et un ADN complémentaire.

10. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la, au moins une, zone de travail est une zone
20 non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

11. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel le substrat est constitué d'un matériau choisi dans le groupe constitué de silicium, d'oxyde de
25 silicium, de nitrure de silicium, de verre, d'un polymère organique, de plastique, d'étain et d'un métal.

12. Dispositif selon la revendication 11, dans lequel le polymère organique est choisi dans le groupe
30 comprenant les polycarbonates, les

polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines.

5 13. Dispositif selon la revendication 11, dans lequel le métal est choisi dans le groupe constitué Au, Ti, Pt, Al, Ni, et l'alliage métallique est l'acier inox.

10 14. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les bordures ont une forme autour de la zone de travail et vue du dessus, choisie parmi une forme annulaire, en étoile, en rectangle, en carré, en triangle, en ellipse, ou en polygone ayant de 4 à 20
15 côtés.

 15. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les bordures ont une section en coupe transversale, dans le sens de la surface active vers la
20 partie haute de la bordure, choisie parmi une forme triangulaire, rectangulaire, conique, tronconique, de demi-cercle, de demi-ellipse.

 16. Dispositif de travail selon la
25 revendication 1, dans lequel les bordures sont mouillantes vis à vis du liquide d'intérêt sur leur partie la plus haute par rapport à la surface active et/ou sur leur versant en regard avec la zone de travail qu'elle entoure.

30

17. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les bordures sont obtenues par emboutissage ou moulage de la surface active.

5 18. Dispositif de travail selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les moyens d'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte comprenant une pompe d'injection du liquide d'intérêt dans la boîte.

10

 19. Dispositif de travail selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les moyens d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte comprennent une pompe d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte.

15

 20. Dispositif selon la revendication 19, dans lequel la pompe d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte est sous la forme d'une pompe d'injection d'un fluide gazeux dans la boîte, par une première ouverture formée sur la boîte, de manière à pouvoir injecter dans la boîte un fluide gazeux chassant le liquide d'intérêt de la boîte par une deuxième ouverture formée sur la boîte.

25

 21. Dispositif selon la revendication 20, dans lequel la pompe d'injection du fluide gazeux comprend un dispositif de saturation du fluide gazeux injecté en vapeur du liquide d'intérêt.

30

22. Dispositif selon la revendication 19, dans lequel la pompe d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte est sous la forme d'une pompe aspirante disposée au niveau d'une ouverture formée sur la boîte de manière à pouvoir extraire le liquide d'intérêt de la boîte en l'aspirant par cette ouverture.

23. Système comprenant un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

10

24. Puce biologique comprenant un dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

25. Puce biologique selon la revendication 24, ladite puce étant choisie dans le groupe constitué des puces à acide nucléique, des puces à anticorps, des puces à antigènes, des puces à protéine et des puces à cellules.

26. Procédé de fabrication d'un dispositif selon la revendication 1, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- fournir un substrat
- former des zones de travail sur ledit substrat,
- structurer la surface du substrat de manière à former une bordure autour des zones de travail,
- traiter la surface sur laquelle les zones de travail et leur bordure ont été formées pour la

rendre sensiblement non mouillante vis à vis du liquide d'intérêt,

- fournir une boîte et y introduire le substrat comprenant les zones de travail entourées par leur bordure, ladite boîte comprenant des moyens pour introduire le liquide d'intérêt dans la boîte et des moyens pour extraire le liquide d'intérêt de la boîte, et
- fermer ladite boîte.

10

27. Procédé de fabrication selon la revendication 26, dans lequel les bordures sont formées sur la surface active par gravure directe de ladite surface active.

15

28. Procédé de fabrication selon la revendication 26, dans lequel les bordures sont formées sur la surface active par dépôt d'un matériau sur ladite surface active puis gravure ou photolithographie dudit matériau.

20

29. Procédé de fabrication selon la revendication 28, dans lequel le matériau déposé est choisi dans le groupe constitué d'une résine, d'une résine photosensible, de polymères organiques, de métaux, de Si, de Si oxydé, et de nitrure de Si.

25

30. Procédé de fabrication selon la revendication 28 ou 29, dans lequel le dépôt d'un matériau sur ladite surface active pour former les bordures est réalisé au moyen d'un procédé choisi parmi

30

un procédé par couchage, par évaporation, par pulvérisation, ou par dépôt électrochimique.

31. Procédé de fabrication selon la
5 revendication 28 ou 29, dans lequel le matériau étant photosensible, les bordures sont réalisée par photolithographie.

32. Procédé de fabrication selon la
10 revendication 26 dans lequel les bordures sont obtenues par emboutissage ou moulage de la surface active.

1 / 4

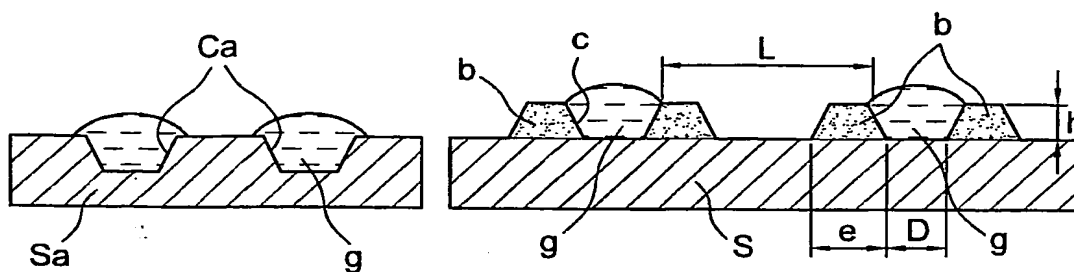


FIG. 1

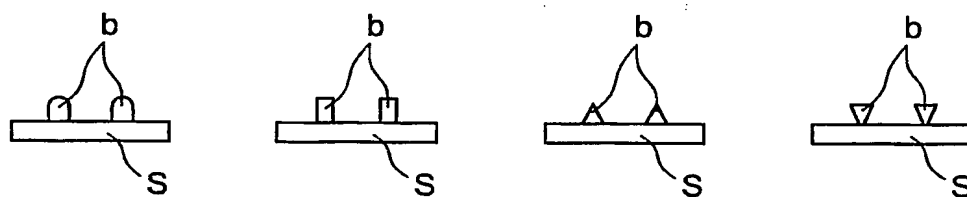


FIG. 2

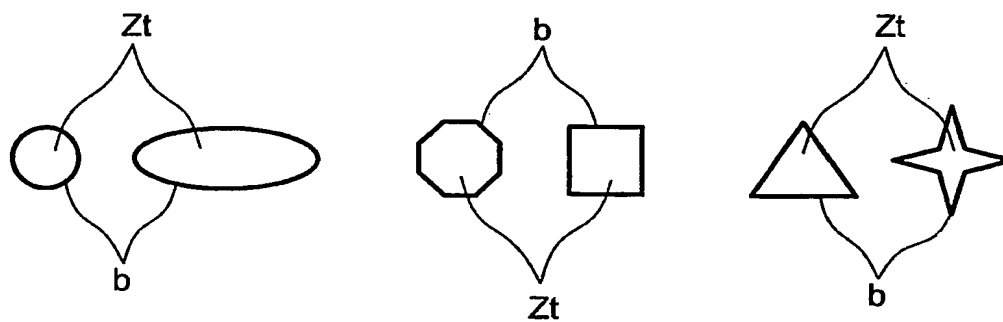


FIG. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 4

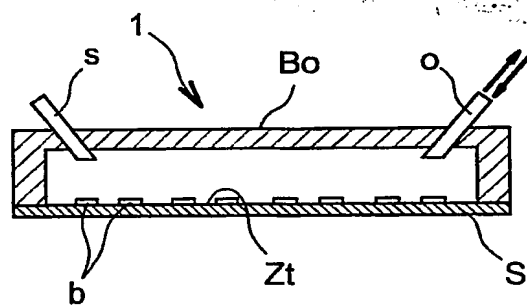
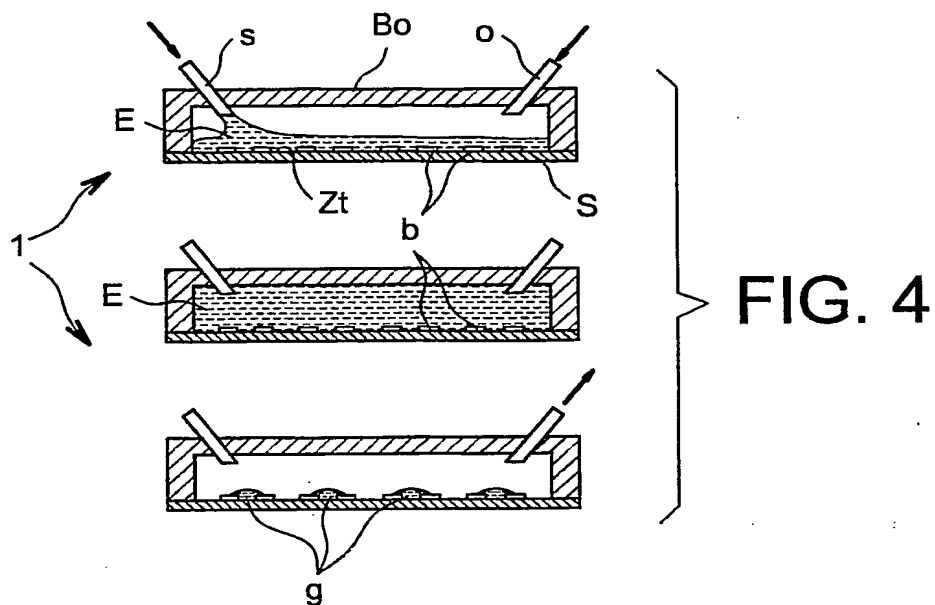


FIG. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 4

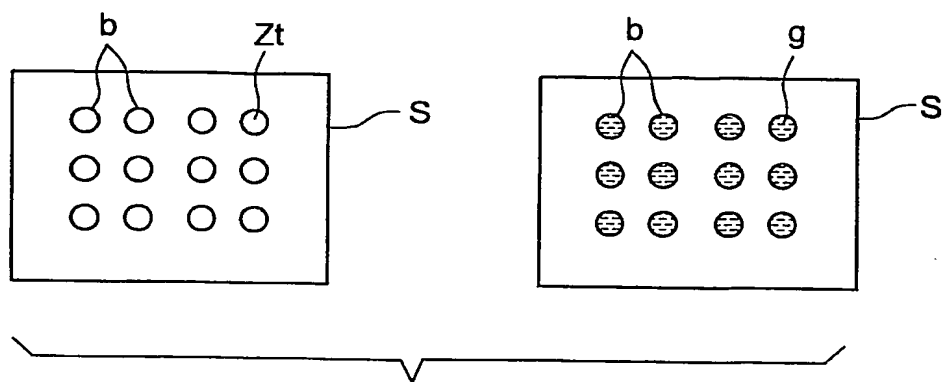


FIG. 6

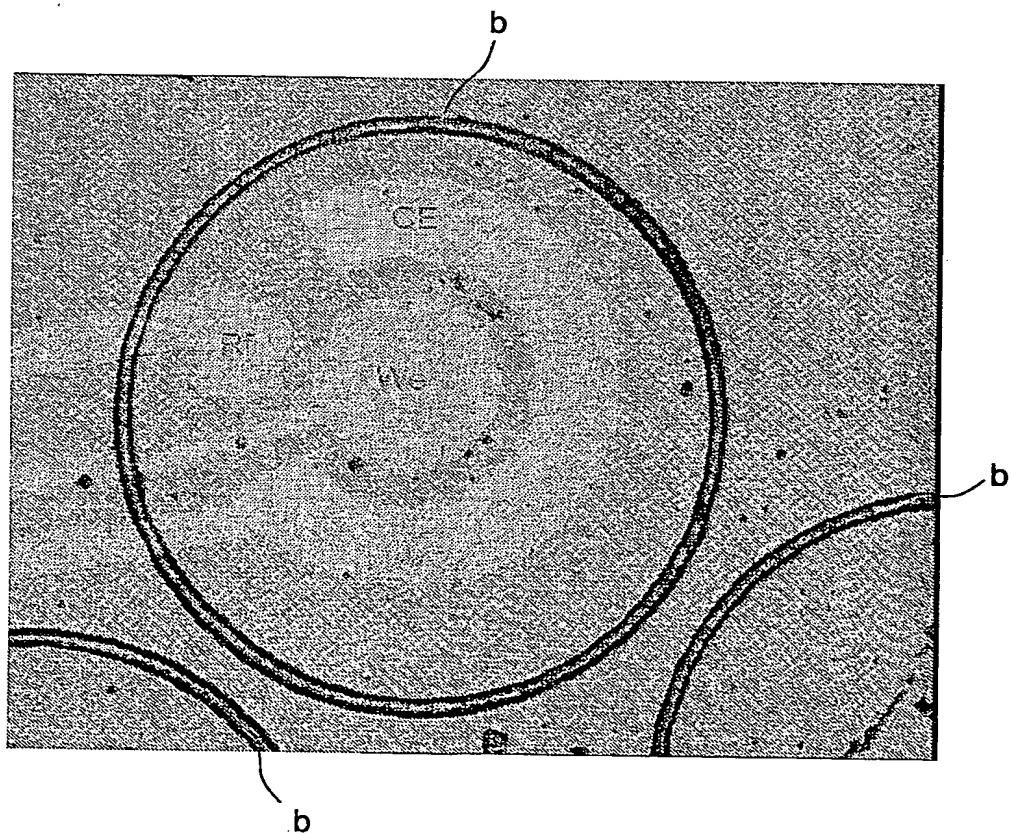


FIG. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 4

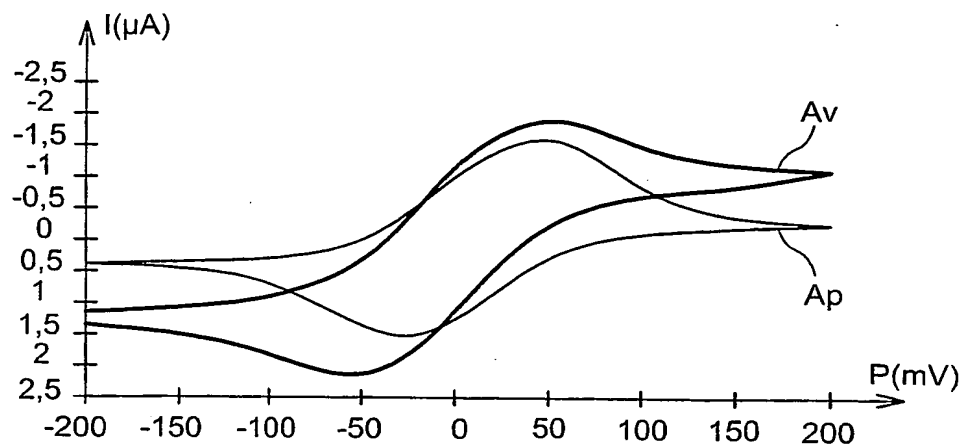
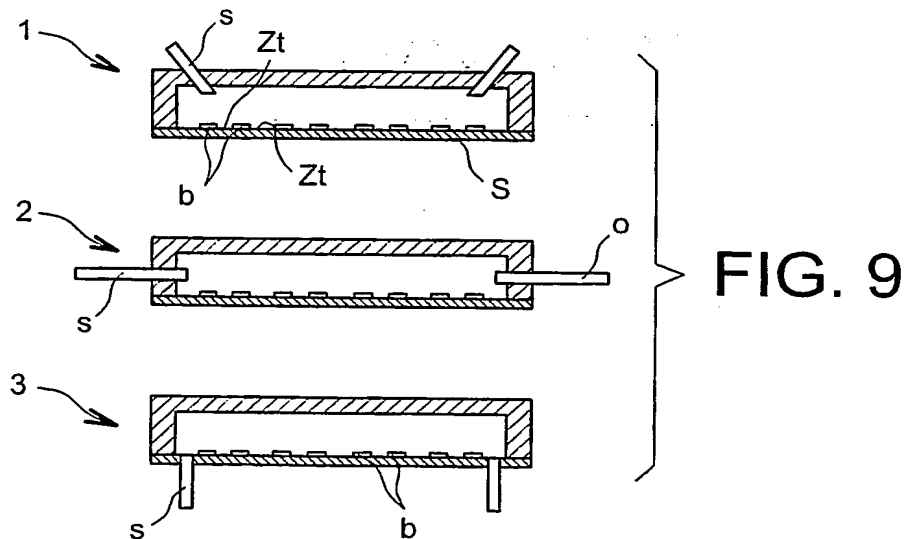


FIG. 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)